台灣農業化學與食品科學（中華民國九十九年二月／第四十八卷第一期：第二十六至三十二頁）
Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science (February, 2010) 48(1): 26-32

台灣金線連酒製品對沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)之致變異性評估

蕭翌柱[1] 廖俊旺[2] 吳明哲[1]*

[1] 行政院農業委員會農業試驗所生物技術組
[2] 國立中興大學獸醫病理生物學研究所

（接受刊載日期：中華民國九十九年一月十八日）

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata, AFH) 具有保肝、鎮痛、利尿、降血糖及降血壓等保健功效，唯以其萃取物配合其他原料調製而成的酒製品-台灣金線連酒，在商業量產前，仍應進行產品安全性評估。本研究係採用安姆氏試驗法 (Ames test) 測試台灣金線連酒製品對沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98、TA100、TA102、TA1535及TA1537等菌株基因回復突變之致變異性 (reverse mutagenicity)。結果顯示，不論供試培養基中是否添加大鼠肝臟活化酵素抽出液 (S9)，台灣金線連酒製品不同處理濃度 (5000、2500、1250、625及312.5 *μg/plate*) 對於沙門氏菌的回復突變菌落數 (colony forming unit, CFU) 皆與陰性對照組無顯著差異，本試驗結果將有助於台灣金線連生技產品後續的研究與發展。

關鍵字：台灣金線連，生技產品，沙門氏菌，安姆氏試驗。

Evaluate the Mutagenicity of *Anoectochilus formosanus* Hayata Wine on *Salmonella typhimurium* Strains

Yih-Juh Shiau[1], Jiunn-Wang Liao[2] and Min-Tze Wu[1]*

[1] *Biotechnology Division, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan*
[2] *Graduate Institute of Veterinary Pathobiology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan*

(Accepted for publication: January 18, 2010)

Anoectochilus formosanus Hayata (AFH) extracts are known to have health effects on protection of liver injury, easing pain, increasing diuresis, and decreasing hyperglycemia and hypertension. However, the safety of AFH wine, made of AFH extracts with other materials, is still needed to be elucidated before marketing. The purpose of this study was to evaluate the mutagenicity of AFH wine on *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA102, TA1535, and TA1537. The Ames test showed that, either in the presence or absence of the rat liver extract (S9 mixture), no reverse mutagenicity of AFH wine (5000, 2500, 1250, 625, and 312.5 *μg/plate*) on all five strains tested can be detected when compared to the negative control. The results of this research represent a significant contribution on the development of the AFH bioproducts.

Key words: *Anoectochilus formosanus* Hayata, Bioproduct, *Salmonella typhimurium*, Ames test.

前　　言

我國傳統醫學強調「攝生以治未病」的觀念，在藥用植物的採擷、炮製及性味辨証等方面，也累積數千年以上的實踐經驗。近年來，國內養生保健產業的發展和天然植物生技產品之開發利用，成效堪稱豐碩，在養生保健蔚為風潮下，以台灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)為原料研製而成的保健茶包及飲品逐漸受到國人喜愛。

研究指出，台灣金線連全植株中，含有金線連醣苷(kinsenoside)、金線連酮(kincenone)及天麻素(gastrodin)等機能性成分，並且抗氧化能力足以媲美銀杏葉和兒茶素[1-4]。動物試驗則發現，金線連水萃液對於四氯化碳(CCl_4)所誘發的動物肝毒性，具有良好的保肝效果，且在沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)回復突變試驗(reverse

* Corresponding author. E-mail: wu@wufeng.tari.gov.tw

mutagenicity test)也無細菌致突變作用[5,6]；若以5 *g/kg*最高限劑量的水萃液餵食大白鼠之急毒性試驗也未產生臨床病症[7]。因此，在學者取台灣金線連水萃液連續90天經口投予大鼠飲用後，評估結果認為長期食用之安全劑量為0.5 *g/kg*[8]。衛生署則於「可供食品使用原料一覽表」中公告其葉部於茶包中用量為每日鮮品10 *g*或乾品1 *g*以下；水粗萃物得以每日0.3 *g*以下添加於飲品、粉末狀、錠狀或膠囊狀食品。

上述文獻已初步評估台灣金線連原材料的安全性及保健功效，另外，探討其乙醇萃取液之抗氧化性並分析化合物含量[9]，或是進行Ames test[10]，試驗結果雖證明其對於不同之致突變劑可以發揮不同程度之抗致突變效果。但是，以台灣金線連乙醇萃取物濃縮後再配合香米酒及其他水果原料調製而成的保健用酒品，若能再次評估作為保健用食品的安全性，將更能保障未來消費大眾的健康。此項飲品的Ames test，是作者繼大鼠之口服急毒性報告[11]後，進一步測試台灣金線連酒對沙門氏菌五種菌株TA98、TA100、TA102、TA1535及TA1537之回復突變致變異性，此一酒製品若能通過毒理安全及功效評估，則未來在技術移轉並商業量產後，應能提供國人另一項具有保健功能的新飲品。

材料與方法

一、試驗規範及材料

1. 試驗規範

試驗依據衛生署「健康食品安全性評估方法」之基因毒性試驗(1999)、美國環保署(USEPA)(*Health Effects Test Guidelines, Bacterial Reverse Mutation Test*, US EPA 712-C-98-247. In: OPPTS *Harmonized Test Guidelines*, Series 870.5100, 1998)及經濟合作暨開發組織(*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Section 4: Health Effects. *No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test*, 2002)等規範進行致變異性試驗。

2. 酒樣品

台灣金線連酒樣品外觀呈黃棕色，主要原料是由台灣金線連全草以58%乙醇水溶液萃取濃縮並添加定量的桂圓等天然果品流浸膏，依一定比例調和香米酒(台農71號香米釀製)(杏花村酒坊，台灣)，製成含酒精濃度52%之酒品且儲存於室溫環境。試驗時，先取50 *mg*酒品並以滅過菌的蒸餾水予以稀釋，再經0.45 *μm*過濾膜過濾作為供試酒樣品。

3. 供試菌株

試驗使用的沙門氏菌TA98 (IFO#14193)及TA100 (IFO#14194)兩種菌株原購自日本醱酵研究所(Institute for Fermentation, Osaka 17-85 Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan)。TA102、TA1535及TA1537菌株為國立中興大學獸醫病理生物學研究所培養。

二、細菌培養基之配製

1. 液體營養培養基(nutrient broth, NB)

稱取8 *g* Difco® Bacto nutrient broth (BD, USA)及5 *g* NaCl配製1,000 *mL*培養基，以121℃、15 *min*，高溫高壓滅菌後，放入4℃保存。

2. 固體營養培養基(nutrient agar plate, NA)

稱取15 *g* Difco® Agar (BD, USA)溶於1,000 *mL* NB營養液，以121℃持續15 *min*高溫高壓滅菌後，迅速分裝至無菌培養皿(20 *mL/plate*)，並在室溫下凝固後倒置，放入37℃烘乾，放入4℃保存。

3. 細菌最低營養需求Volgel-Bonner salts之50倍濃度儲存液(50X VB Salt Stock)

以670 *mL*無菌水加熱至45℃，依序加入10 *g* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、100 *g* Citric acid、100 *g* monohydrate、500 *g* K_2HPO_4及175 *g* $NaHNH_4PO_4 \cdot 4H_2O$，待定量至1,000 *mL*後，再以121℃高溫滅菌15 *min*，回溫後放入4℃冰箱保存備用。

4. 固體最低營養需求培養基(minimal glucose agar plate, MA)

取15 *g* Agar加入930 *mL*無菌水，以121℃、15 *min*高溫高壓滅菌後，加入20 *mL*無菌50x VB salt及50 *mL*無菌40%葡萄糖混合均勻，待溶液降溫至50℃，加入3.15 *mL*無菌Ampicillin，倒入10 *cm*培養皿(20 *mL/plate*)，室溫下凝固後倒置，先以37℃烘乾後再放入4℃冰箱保存供致變異性試驗用。

5. 軟性瓊脂(soft agar)培養基

以0.75% Agar與0.5% NaCl混合均勻，分裝倒入2 *mL*試管，再以121℃高溫滅菌15 *min*，回溫後放入4℃冰箱保存備用。使用前再加熱溶解並於水浴槽內保持45℃。

三、測試無細菌毒性之最高供試樣本濃度及製備肝臟活化酵素(S9)

1. 測試無細菌毒性之最高供試樣本濃度

台灣金線連酒樣本先以無菌水調配成2、10及50 *mg/mL*三種濃度；另外，已於37℃震盪培養箱培養18 *h*之供試菌液，則以無菌的PBS緩衝液連續10倍稀釋成10^{-6}/*mL*及10^{-7}/*mL*備用。進行試驗時，自上述三種樣本濃度各吸取0.1 *mL*並分別與0.1 *mL*的菌液混合，再加入2 *mL* soft agar震盪均勻後，倒入NA培養基上；最終的台灣金線連酒試驗濃度設定為200、1000及5000 *μg/plate*。soft agar凝固後，將NA培養皿倒置於37℃培養箱，經隔夜培養後取出並計算每一個供試培養皿中的菌落數(colony forming unit, CFU)，以得知無細菌毒性之最高供試樣本濃度。

2. 製備肝臟活化酵素(S9)

製備S9的方法係參考Ames氏等人的報告[12,13]，首先將Aroclor 1254藥品(Lot#1452, MoltoxTM, USA)溶於玉米油中配成200 *mg/mL*濃度，以500 *mg/kg*劑量腹腔注射於體重約200 *g*之雄性大鼠(*Rattus norvegicus*, Spraque-Dawley strain)，以誘發產生S9。五天後犧牲大鼠且在無菌操作台取出肝臟秤重，再加三倍體積之0.15 *M* KCl。

將肝臟組織剪碎研磨，於4℃溫控環境下，以9,000 × *g* (10,000 *rpm*)離心10 *min*再吸取上清液，即為S9抽出液；S9抽出液中之蛋白質含量經定量後，以無菌水稀釋成40 *mg/mL*濃度，儲存於-80℃冰箱備用。在每一試驗之前，需配製新鮮的S9與測試藥劑混合液，即每1 *mL*的S9混合液，含有100 *μL* S9抽出液、8 *μM* $MgCl_2$、4 *μM* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (sodium salt)、33 *μM* KCl、5 *μM* glucose-6-phosphate (mono sodium salt)及100 *μM* sodium phosphate buffer (pH 7.4)。

四、回復突變致變異性之Ames test

1. 陽性對照組及陰性對照組培養基之配製

培養基中未添加S9混合液(-S9)的陽性對照組，需依不同的菌株種類，個別加入適當的直接致突變劑，其用量及種類如下：1) TA98菌株：2.5 *μg/plate* 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) (Sigma-Aldrich Co., USA)；2) TA100菌株：5 *μg/plate* sodium azide (SA) (Sigma-Aldrich Co., USA)；3) TA102菌株：0.5 *μg/plate* mitomycin C (MMC) (Sigma-Aldrich Co., USA)；4) TA 1535菌株：5 *μg/plate* sodium azide (SA) (Sigma-Aldrich Co., USA)；以及5) TA1537菌株：50 *μg/plate* 9-aminoacridine (9-AA) (Sigma-Aldrich Co., USA)。若是培養基中為添加S9混合液(+S9)之陽性對照組，則不論是何種供試菌株，皆在其培養基中另外添加5 *μg/plate* 2-aminoanthracene (2-AA) (Sigma-Aldrich Co., USA)作為間接致突變劑。另外，培養基中無論有無添加S9混合液，均使用無菌蒸餾水作為直接或間接致突變劑，並作為陰性對照組之培養基。

2. 台灣金線連酒測試劑量

取無細菌毒性之台灣金線連酒最高樣本濃度(5,000 *μg/plate*)為測試劑量基準，每次以稀釋兩倍的方式，連續取四個濃度(即2500、1250、625及312.5 *μg/plate*)，對照組則是使用無菌蒸餾水作為試劑。配製之各項台灣金圓酒樣本，在進行試驗時，個別吸取0.1 *mL*另再加入0.2 *mL*之histidine (0.5 *mM*, Merck, kGaA, Germany)與biotin (0.5 *mM*, Sigma-Aldrich Co., USA)混合液及0.1 *mL*的菌液；若是含有S9混合液之處理組，則除了培養基中需添加0.2 *mL* S9混合液外，還需要混合45℃之2 *mL*軟性瓊脂(內含0.5% NaCl)，混合後的供試菌液再倒入MA培養皿上，在室溫下凝固後，倒置於37℃培養箱中培養48 *h*，再計算每一個培養皿回復突變致變異性之CFU。

五、統計分析及結果判讀

以上試驗每種處理皆重覆三次；試驗取得的數據，先計算其算術平均值並以CoStat V. 6.311統計軟體(CoHort software, 2005, USA)進行單向變異數分析(One-way ANOVA)，再以最小顯著性差異法(least significant difference test, LSD test)檢定各處理間差異的顯著性($p < 0.05$)。另外，不論測試樣品是否經S9抽出液活化處理，若有二個以上處理組之細菌回復突變 CFU高於陰性對照組二倍以上，則判定該供試樣品之致變異性結果為陽性反應。

結　　果

一、無細菌毒性之最高樣本濃度試驗

台灣金線連酒樣本在最終測試濃度分別為200、1,000及5,000 *μg/plate*的情形下，與各種沙門氏菌菌株作用18 *h*，結果顯示，TA98菌株在稀釋成10^{-6}/*mL*時，對照組之平均CFU為196.3（表一），添加200、1,000及5,000 *μg/plate*濃度之台灣金線連酒處理組，其CFU依序為190.0、192.0和196.0，經比較後並無顯著差異；若是將TA98菌株稀釋為10^{-7}/*mL*進行測試，則對照組之平均CFU為18.0，另以200、1,000及5,000 *μg/plate*濃度處理者，其平均CFU分別為22.7、20.3及19.7，彼此亦無顯著差異。對於TA100、TA102及TA1535三種菌株而言，不論其稀釋成10^{-6}/*mL*或是10^{-7}/*mL*，各處理組與對照組之間，其平均CFU皆無顯著差異；至於TA1537菌株，在其稀釋成10^{-6}/*mL*時，其對照組之平均CFU (126.3)雖與台灣金線連酒各處理組之121.0~132.7無顯著差異，但當其稀釋成10^{-7}/*mL*時，以1,000 *μg/plate*樣本濃度處理者，其平均CFU (18.0)顯著高於對照組之13.7。由上述各試驗結果得知，即使以5,000 *μg/plate*最高樣本濃度處理沙門氏菌五種菌株後，仍未有細菌毒性的情形產生。

二、回復突變致變異性之Ames test

從台灣金線連酒對沙門氏菌五種菌株最高無毒性濃度(5,000 *μg/plate*)向下連續二倍稀釋，再選取數個濃度(2,500、1,250、625及312.5 *μg/plate*)進行Ames試驗，藉以檢測台灣金圓酒分別在未含S9酵素(-S9)以及含有S9酵素(+S9)條件下，其代謝產物對沙門氏菌五種菌株之基因致變異性。結果顯示，在-S9情形下，台灣金線連酒對TA98之回復突變致變異性，其陰性對照組平均CFU為26.0（表二、圖一）；使用2.5 *μg/plate* 4-NQO作為直接致突變劑之陽性對照組，其細菌回復突變CFU則高達159.7；至於測試濃度為5,000、2,500、1,250、625及312.5 *μg/plate*之各處理組，其細菌回復突變平均CFU依序為31.3、29.7、32.3、24.3及28.0，上列各項數值雖與陰性對照組(26.0)比較並無顯著差異，卻顯著低於陽性對照組之159.7。若是在+S9的作用下，台灣金線連酒對TA98菌株之回復突變致變異性，其陰性對照組平均CFU為29.3；使用5 *μg/plate* 2-AA作為間接致突變劑之陽性對照組，其細菌回復突變CFU達到109.3；至於測試濃度為5,000、2,500、1,250、625及312.5 *μg/plate*之各處理組，其細菌回復突變平均CFU分別為32.3、35.0、32.3、32.0及31.7，上列數值亦與陰性對照組(29.3)無顯著差異，但仍顯著低於陽性對照組(109.3)。表二結果也顯示，不論在-S9或是+S9的試驗中，台灣金線連酒不同處理濃度對於沙門氏菌其他四種供試菌株(TA100、TA102、TA1535、TA1537)的回復突變平均CFU，皆與其陰性對照組無顯著差異，也都顯著低於陽性對照組。

討　　論

在我國民間已延用數千年的傳統保健藥材如當歸、人參、山藥和天麻等，經適量燉煮後食用，應無安全上的疑慮；但是，對於某些特定植物原料，則需經炮製程序及安全評估後方可使用，例如，Peng氏曾選取附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花及射干等六種藥材水萃

表一　不同台灣金線連酒處理濃度對沙門氏菌(TA98, TA100, TA102, TA1535及TA1537)之細菌毒性試驗

Table 1. Bactericidal test of different *Anoectochilus formosanus* Hayata wine treated concentrations in *Salmonella typhimurium* strains (TA98, TA100, TA102, TA1535, and TA1537)

Treatment (*mg/plate*)	Number of average revertants (*CFU/plate*)[1]									
	TA98		TA100		TA102		TA1535		TA1537	
	10^{-6}/*mL*	10^{-7}/*mL*	10^{-6}/*mL*	10^{-7}/*mL*	10^{-6}/*mL*	10^{-7}/*mL*	10^{-6}/*mL*	10^{-7}/*mL*	10^{-6}/*mL*	10^{-7}/*mL*
0	196.3[a2]	18.0[a]	97.7[a]	12.0[a]	222.3[a]	21.0[a]	135.0[a]	12.0[a]	126.3[a]	13.7[b]
200	190.0[a]	22.7[a]	94.0[a]	10.3[a]	233.0[a]	21.0[a]	135.0[a]	12.7[a]	125.3[a]	16.3[ab]
1000	192.0[a]	20.3[a]	100.7[a]	10.3[a]	222.3[a]	26.3[a]	140.0[a]	11.3[a]	121.0[a]	18.0[a]
5000	196.0[a]	19.7[a]	92.0[a]	11.7[a]	219.3[a]	22.0[a]	140.7[a]	12.0[a]	132.7[a]	16.0[ab]

1 *CFU/plate*: colony forming unit per plate.

2 Means followed by the same letter in the same column are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significance difference (LSD) test.

表二 不同台灣金線連酒處理濃度在培養基添加肝臟活化酵素(+S9)與不添加肝臟活化酵素(-S9)時，對沙門氏菌(TA98、TA100、TA102、TA1535及TA1537)回復突變致變異性之試驗

Table 2. Revertant changes of different *Anoectochilus formosanus* Hayata wine treated concentrations in *Salmonella typhimurium* strains (TA98, TA100, TA102, TA1535, and TA1537) mutagenicity test

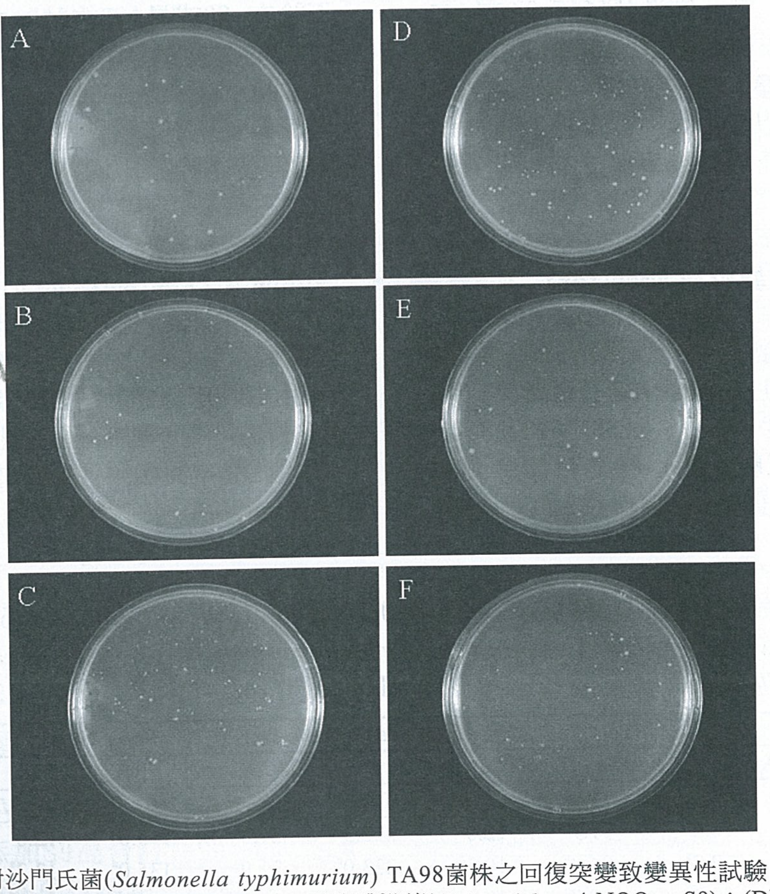
Treatment (μg/plate)	Number of average revertants (*CFU/plate*)[1]									
	TA98		TA100		TA102		TA1535		TA1537	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
PC[2]	159.7[a4]	109.3[a]	2005.3[a]	730.0[a]	1026.0[a]	1250.0[a]	827.7[a]	318.7[a]	1136.3[a]	133.3[a]
NC[3]	26.0[b]	29.3[b]	125.0[b]	119.0[b]	334.3[b]	382.3[b]	11.3[b]	9.3[b]	9.7[b]	7.0[b]
5000	31.3[b]	32.3[b]	140.7[b]	124.3[b]	350.0[b]	375.3[b]	13.3[b]	7.7[b]	10.3[b]	5.3[b]
2500	29.7[b]	35.0[b]	142.0[b]	140.7[b]	335.3[b]	374.3[b]	10.7[b]	8.3[b]	9.7[b]	7.3[b]
1250	32.3[b]	32.3[b]	124.7[b]	132.7[b]	319.3[b]	414.0[b]	13.7[b]	10.7[b]	9.3[b]	5.3[b]
625	24.3[b]	32.0[b]	129.7[b]	131.7[b]	345.7[b]	373.7[b]	11.0[b]	8.7[b]	9.0[b]	5.3[b]
312.5	28.0[b]	31.7[b]	132.7[b]	128.0[b]	351.3[b]	359.0[b]	11.3[b]	11.0[b]	9.7[b]	5.7[b]

1 PC: positive control; The positive reagents without S9 mix reactions were 2.5 *μg/plate* 4-nitroquinoline-N-oxide for TA98, 5 *μg/plate* sodium azide for TA100 and TA1535, 0.5 *μg/plate* mitomycin C for TA102, and 50 *μg/plate* 9-aminoacridine for TA1537; Further, the positive reagent with S9 mix reactions was 2-aminoanthracene for all Salmonella strains.

2 NC: negative control; The negative reagents was sterile distilled water (SDW) for all Salmonella strains..

3 *CFU/plate*: colony forming unit per plate.

4 Means followed by the same letter in the same column are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significance difference (LSD) test.



圖一 台灣金線連酒對沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*) TA98菌株之回復突變致變異性試驗。(A)陰性對照組(蒸餾水，-S9)；(B)陰性對照組(蒸餾水，+S9)；(C)陽性對照組(2.5 *μg/plate* 4-NQO，-S9)；(D)陽性對照組(5 *μg/plate* 2-AA，+S9)；(E)台灣金線連酒處理組(5000 *μg/plate*，-S9)；(F)台灣金線連酒處理組(5000 *μg/plate*，+S9)

Fig. 1. Revertant changes of *Anoectochilus formosanus* Hayata wine (AFH wine) in *Salmonella typhimurium* strain TA98 mutagenicity test. (A) Blank control (DW, -S9); (B) Blank control (DW, +S9); (C) Positive control (2.5 *μg/plate* 4-NQO, -S9); (D) Positive control (5 *μg/plate* 2-AA, +S9); (E) AFH wine treatment (5000 *μg/plate*, -S9); (F) AFH wine treatment (5000 *μg/plate*, +S9).

液，檢測對沙門氏菌三種菌株(TA98、TA100及TA1535)之回復突變致變異性，結果顯示，供試培養基中不論是否含有S9混合液，上述六種藥材處理組之回復突變CFU與陰性對照組相較並無明顯差異，顯示上述六種材料的水萃取物在沙門氏菌回復突變致變異性檢測並不具有致變異性[14]；若是以一般傳統常用於製造美白化妝品之中藥材為測試對象，則除了地膚子與黃連二種藥材外，包括薏仁、冰片、牛蒡、艾草、連翹、梔子花、山楂、牛膝、丹參、冬青葉、水萍、冬瓜子和百合，皆顯示無細菌回復突變致變異性[15]。

上述試驗所採用的沙門氏菌回復突變致變異性檢測原理，是利用一系列具有組氨酸(histidine)需求性之沙門氏菌突變菌系(TA98、TA100、TA102、TA1537、TA1538)在受到致突變物質刺激時，會由需要histidine之營養缺乏型回復突變為能自行合成histidine之野生型，藉由無histidine之培養基進行檢定，可以測知供試樣本對於上述菌系是否具有致突變性。S9則是由大鼠肝臟製備而得的代謝活化酵素，有些致突變劑需經細菌體內的代謝活化才能顯現出致突變作用，但此種代謝活化作用有賴於細胞內微粒體混合功能性氧化酵素，因沙門氏菌體內無此類酵素，因此，外加S9混合物具有提高沙門氏菌回復突變檢出率的效果[16]。

以天然植物或是利用如木瓜蛋白酵素(papain)等食品添加物研製而成的產品，雖有可能在進行Ames test時，因材料本身含有histidine成分，導致檢測出偽陽性(false positive)的錯誤訊息[17,18]，但是食品原材料若能以加熱處理，或可降低在沙門氏菌致突變性評估試驗中產生偽陽性的機率[19]。本試驗是以台灣金線連酒製品為研究樣本，調製酒品使用的萃取液是先以58%乙醇水溶液在常溫下淹浸原材料後再進行減壓濃縮，雖非在高溫下取得萃取液，但在探討對於沙門氏菌五種菌株在最高無細菌毒性濃度(5,000 *μg/plate*)下的致變異性反應，仍顯示對細菌基因突變測試結果為陰性反應(表一、表二)，評估供試樣本對於沙門氏菌回復突變應不具有致變異性。此外，本供試樣品除含有台灣金線連萃取液外，其於副原料皆為常見之食品或水果，且添加的萃取液用量皆在衛生署公告的範圍之內。因此，含52%酒精濃度的供試製品在試驗時雖然會因加入無菌蒸餾水稀釋後，隨著酒精濃度降低之故，可能會有微量沉澱物質產生，但應不致於影響毒理安全評估的正確性。

本研究主要目的係依照食品安全評估的方法與步驟，期能開發出兼具保健功效以及產業應用價值的台灣金線連酒產品。未來，此製品將再進行亞急性毒性測試(28天餵食毒性試驗)以及效能評估，以確保民眾飲用安全性及保健功效。台灣金線連酒製品若能順利通過檢驗與行銷，應能增加稻農和果農們的實質收益，並且有助於我國農村經濟的永續發展。

參 考 文 獻

(1) X. M. Du, T. Yoshizawa and Y. Shoyama: Butanoic acid glucoside composition of whole body and *in vitro* plantlets of *Anoectochilus formosanus. Phytochemistry,* **49**: 1925-1928 (1998).

(2) D. F. Hung: The Mechanism Study of Hepatoprotective Activity of *Boehmeria* Species and *Anoectochilus* Species. pp. 95. Master thesis, Kaohsiung Medical Univ., Kaohsiung (2000).

(3) S. Y. Wang, Y. H. Kuo, H. N. Chang, H. S. Tsay, K. F. Lin, N. S. Yang and L. F. Shyur: Profiling and characterization of antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1859-1865 (2002).

(4) S. H. Tzeng: Tissue culture of *Anoectochilus formosanus* Hayata and quantitative analysis of gastrodin. pp. 93. Master Thesis of National Chung-Hsing Univ., Taichung (2005).

(5) J. M. Lin, C. C. Lin, H. F. Chiu and S. G. Lee: Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *Am. J. Chin. Med.*, **21**: 59-69 (1993).

(6) L. T. Wu, Y. W. Wu, C. C. Shih, Y. J. Ko and W. C. Lin: Primary studies on the genotoxicity of aqueous extracts from *Anoectochilus formosanus* and *Glycine tomentella. J. Chin. Med.*, **12**: 173-178 (2001).

(7) S. Y. Liu, T. W. Chang, J. Y. Wang, A. H. Chang and S. C. Wang: Studies on the varietal characters and acute toxicity of *Anoectochilus* spp. *J. Agric. Res. China,* **47**: 242-258 (1998).

(8) W. C. Lin, C. C. Shih and Y. W. Wu: Effects of crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* Hayata administered to pregenant and lacting rats on their offspring. *J. Chin. Med.*, **11**: 79-86 (2000).

(9) M. C. Huang: Effects of freezing and drying on the antioxidant activity of water or ethanol extracts of *Aneoctochilus formosanus* Hayata. pp. 99. Master thesis. Department of Food Science and Biotechnology. National Chung Hsing University. Taipei (2005).

(10) C. H. Tsai: Studies on antimutagenic activity of ten plants grown in Taiwan. pp. 140. Master thesis. Department of Food Science. National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung. (2000).

(11) Y. H. Shiau, J. W. Liao and M. T. Wu: Safety evaluation for the bioproduct of *Anoectochilus formosanus* Hayata. Part I. Acute oral toxicity of Taiwan Jin-Yuan wine in rats. *J. Taiwan Agric. Res.*, **57**: 183-192 (2008).

(12) B. N. Ames: The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: *Chemical Mutagens*: Principles and Methods for Their Detection. vol. 1, pp. 267-282. A. Hollander. Plenum Press, New York, USA (1971).
(13) B. N. Ames, J. McCann and E. Yamasaki: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella test. *Mutat. Res.*, **31**: 347-363 (1975).
(14) W. H. Peng: Studies on hepatotoxicity and kidney toxicity of Chinese herbal medicines. *Yearbook Chin. Med. Pharm.*, **26**: 253-312 (2008).
(15) G. L. Chen: The safety studies of Chinese herbs using in cosmetics (II). *Yearbook Chin. Med. Pharm.*, **21**: 307-340 (2003).
(16) D. M. Maron and B. N. Ames: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**: 173-215 (1980).
(17) M. J. Prival, V. F. Simmon and K. E. Mortelmans: Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results. *Mutat. Res.*, **260**: 321-329 (1991).
(18) M. J. Prival and V. C. Dunkel: Reevaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of chemicals previously identified as "false positives" in the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**: 1-24 (1989).
(19) H. Oshite, M. Oda and V. C. Nguyen: Desmutagenicity of soybean after heating. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**: 1152-1155 (1996).